

オートファジーによるミトコンドリア恒常性維持機構を介した 膵β細胞からの第2相インスリン分泌制御機構

青柳 共太

杏林大学医学部生化学

細胞内小胞の融合にはSNAREタンパク質と呼ばれる一群のタンパク質が関与している。全てのSNAREタンパク質はSNAREモチーフと呼ばれる特徴的な構造を有しており、このSNAREモチーフを介してSNAREタンパク質同士は複合体を形成する。SNAREタンパク質は小胞膜に局在するv-SNAREと輸送先の膜に局在するt-SNAREに分類される。それぞれのSNAREタンパク質は特定の細胞内局在を示すため、特定のv-SNAREとt-SNAREが複合体を形成することが小胞膜の特異的な輸送と融合にとって重要である。

VAMPファミリーはt-SNAREとして働くタンパク質である。VAMPファミリーはVAMP1-5とVAMP7、VAMP8の7種類が知られているが、膵β細胞においてはVAMP2、VAMP3、VAMP4、VAMP8が発現し、それぞれインスリン分泌や細胞内小胞輸送に関与することが報告されている。一方、膵β細胞におけるVAMP7の役割は全く明らかにされていない。VAMP7は神経シナプスにおける情報伝達物質の分泌や、細胞内小胞輸送などに関与することが報告されている。また、不要となったオルガネラやタンパク質凝集体を脂質二重膜で取り囲んで分解するオートファジーに関与することも近年、示唆されている。そこで本研究において私は膵β細胞におけるVAMP7の生理的役割について明らかにすることを目的として膵β細胞特異的VAMP7欠失(VAMP7BKO)マウスの解析を行った。

まず、VAMP7BKOマウスより膵島を単離してグルコース刺激依存的なインスリン分泌について検討を行った。野生型の膵島をグルコースで刺激すると急峻で一過的な第1相分泌が観察された後、持続的な第2相分泌が観察される。ところがVAMP7BKO膵島では第2相インスリン分泌が特異的に減弱していることを見いだした。一方、生化学的な解析や免疫染色によりVAMP7はインスリンを内包するインスリン顆粒には局在しないことが明らかとなった。すなわち、VAMP7はインスリン顆粒と細胞膜の融合(開口放

出)には関与しないにもかかわらず、第2相インスリン分泌を選択的に制御していることを見いだした。

次に、VAMP7が関与することが示唆されていたオートファジーに着目した。野生型膵島に比べVAMP7BKO膵島では飢餓刺激依存的に惹起されるオートファジーが減弱していた。さらに、VAMP7BKO膵島にVAMP7を強制発現するとグルコース刺激依存的なインスリン分泌が回復すると共に、飢餓刺激依存的なオートファジーも回復することを見いだした。

VAMP7によるオートファジーの制御とインスリン分泌の関連を明らかにするために、オートファジーによるミトコンドリア恒常性維持機構に着目した。膵β細胞は細胞内ATP濃度依存的にインスリンを分泌するため、細胞外グルコース濃度に応じたインスリン分泌を行う上で、グルコース刺激依存的にATPを産生するミトコンドリアは非常に重要な役割を果たす。一方、ミトコンドリアは自身の呼吸反応によって産生されるROSに常に曝されているため、ミトコンドリアには機能不全となったタンパク質や脂質が徐々に蓄積していく。ミトコンドリアは融合と分裂を繰り返すことで機能不全となった部品を機能不全ミトコンドリアとして分離し、オートファジーにより除去することで細胞全体としてミトコンドリアの恒常性を維持していることが知られている。つまり、VAMP7BKO膵島ではVAMP7欠失により本来オートファジーで除去されるべき機能不全ミトコンドリアが蓄積したために、ATP産生能が低下し、インスリン分泌が減弱したと考えた。そこでまず、VAMP7欠失β細胞における機能不全ミトコンドリアの蓄積量について検討を行った。機能不全ミトコンドリアは正常なミトコンドリアよりも多量のROSを産生することが知られている。そこで野生型およびVAMP7BKO膵島におけるROS産生量について調べたところ、VAMP7BKO膵島では有意にROS産生能が増加していることが明らかとなった。次に、機能的なミトコンドリアを

mitotrackerで染色したところ、VAMP7欠失 β 細胞ではmitotrackerの染色性が著しく減弱していることを見いだした。また電子顕微鏡でVAMP7欠失 β 細胞を観察したところ、ミトコンドリアが膨潤している様子と共に、異常なクリステ構造を示すミトコンドリアが多数観察されることを見いだした。さらに、オートファジーによって除去されるオルガネラやタンパク質凝集体などに選択的に蓄積するp62がVAMP7BKO豚島のミトコンドリア画分において有意に増加していることを見いだした。

最後に、刺激依存的なミトコンドリア機能について検討を行った。ミトコンドリア膜電位感受性色素であるTMREで染色したVAMP7欠失 β 細胞を観察すると、野生型 β 細胞に比べて刺激依存的な電位変化が減弱していることを見いだした。さらに、グルコース刺激依存的なミトコンドリア内 Ca^{2+} 上昇も減弱していることを明らかにした。最後に、グルコース刺激依存的なATP産生能について調べてみると、グルコース刺激前や第1相分泌に相当する刺激後5分の時点では野生型豚島とVAMP7BKO豚島で有意な差は観察されなかったが、第2相分泌に相当する刺激後20分以降ではVAMP7BKO豚島においてATP産生能が有意に減弱することを見いだした。

以上の結果より、VAMP7はオートファジーを制御することにより豚 β 細胞内のミトコンドリア恒常性維持に関与することで第2相インスリン分泌を制御していることが明らかとなった(下図)。

【List of publication】

1. Aoyagi K, Rossignol E, Hamdan FF, Mulcahy B, Xie L, Nagamatsu S, Rouleau GA, Zhen M, Michaud JL. Hum Mutat.36: 753-757.
2. Aoyagi K, Ohara-Imaizumi M, Itakura M, Torii S, Akimoto Y, Nishiwaki C, Nakamichi Y, Kishimoto T, Kawakami H, Harada A, Takahashi M, Nagamatsu S. Diabetes.65: 1648-1659.

【講演記録】

1. 青柳共太：第58回日本糖尿病学会年次学術集会，下関，平成27年5月21-24日。
2. 青柳共太：第67回日本細胞生物学会大会，東京，平成27年6月30日-7月2日。
3. 青柳共太：第88回日本生化学会大会，第38回日本分子生物学会年會合同大会，神戸，平成27年12月1-4日。

